

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK**

Protozoa kao rezervoari patogenih bakterija

Protozoa as reservoirs for pathogenic bacteria

SEMINARSKI RAD

Vid Bakovi
Preddiplomski Znanosti o okolišu
(Undergraduate Study of Environmental sciences)
Mentor: doc. dr. sc. Renata Matonić ikin Kepić

Zagreb, 2008.

SADRŽAJ

1. Uvod	2
2. Bakterije	3
2.1. Legionella.....	3
2.2. Salmonella.....	4
3. Protozoa	6
3.1. Acanthamoeba	6
3.2. Tetrahymena	8
4. Zaključak	9
5. Literatura	10
6. Sažetak	11
7. Summary	11

1. Uvod

Jednostani ni organizmi i njihov okoliš se sve više istražuju, zahvaljuju i sve sofisticiranijim tehnikama istraživanja. Odnosi izme u bakterija i protozoa su nam sve jasniji, te se pokazalo da su važniji nego što se smatralo. Ovaj rad e razjasnit me uodnose bakterija i protozoa, te e istražiti važnost i mogu e posljedice tih me uodnosa, koje se mogu odnositi i na ovjeka. Ekologija ovog mikro-svijeta se poja ano istražuje prvenstveno radi potencijalnog utjecaja na našu vrstu, te za razumijevanje i predvi anje budu ih opasnosti. U ovakvim istraživanjima najviše je prou avana bakterija *Legionella pneumophila*, uglavnom zbog toga što je to patogena bakterija koja je uspjela razviti mehanizme uz iju pomo može zaraziti stanice kompleksnih višestani nih organizama, poput naših eukariotskih stanica. Bitno je razumjeti gdje i kako je ova bakterija evoluirala takve mehanizme za infekciju i preživljavanje unutar stanice doma ina, kako bismo mogli predvidjeti budu e opasnosti od zaraze te kao i drugih intracelularnih bakterija. Ovi adaptacijski mehanizmi bakterije variraju od geneti ke razmijene materijala do pojave endosimbionstskog na ina života.

Pretpostavlja se da su bakterije uspjele razviti te složenije mehanizme zaraze upravo radi njihovih interakcija s raznim jednostani nim organizmima protozoa. Dobro istražen primjer protozoa kao domadara su slobodno žive amebe i to raznih rodova. Jedan takav rod je *Acanthamoeba*, koja u sebe aktivno uzima razne patogene bakterije, me u koje spada i rod *Legionella*. Nakon ulaska u organizam, bakterija i praživotinja uspostave suživot u kojemu mogu profitirati, ili obrnuto djelovati da si otežaju preživljavanje. Razne bakterije s raznim vrstama roda *Acanthamoeba* daju razli ite rezultate. Ovo bi moglo predstavljati primjer ko-evolucije tako da jedna vrsta ima utjecaj na evolucijsku liniju druge vrste. Problem je u tome što je veoma teško ili gotovo nemogu e dokazati ko-evolucijske odnose izme u te dvije vrste. Važno je napomenuti da susret ova dva organizma nije samo radi postizanja razvijenijih mehanizama zaraze bakterija, nego te praživotinje imaju ulogu i u preživljavanju tih patogenih bakterija i u

njihovom rasprostranjenju puno veći areal. Rezultati ovakvih istraživanja nam pružaju informacije koje bi nas mogle dovesti do veće sigurnosti od zaraze patogenim bakterijama, te su vrlo važni za istraživanja epidemiologije, ekologije, mikrobiologije, evolucije i još puno raznih struka.

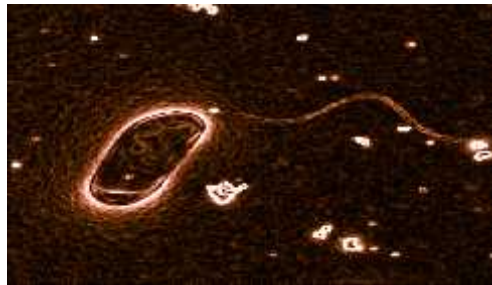
2. Bakterije

Najveća skupina recentno živu ih prokariota su bakterije. Nalaze se gotovo u svim postojećim uvjetima na Zemlji, no u ovom radu naglasak je na sposobnosti bakterije da naseli eukariotske stanice praživotinje, te važnost tog suživota. Patogene bakterije su bakterije koje uzrokuju oštećenje u domaćinskoj stanici, i imaju stupanj patogenosti koju zovemo virulencija. Virulencija različitih bakterija ovisi o tome koliko su prilagođene preživljavanju unutar stanica različitih domaćina. Glavni mehanizmi zaraze bakterija su ulazak unutar živih stanica i sposobnost stvaranja toksina. Proces ulaska obuhvaća kolonizaciju, stvaranje ekstracelularnih spojeva koji omogućuju lakše probijanje bakterije u stanicu i sposobnost bakterije da nadvlada obrambene mehanizme stanice domaćara. Postoje dva tipa toksina koje tvore bakterije nakon ulaska u domaćinsku stanicu, a to su endotoksini i egzotoksini. Razlika između endotoksina i egzotoksina ogleda se u tome da endotoksin luče žive bakterije u netopljivom obliku, dok se egzotoksini izlučuju u topljivom obliku. Oba tipa toksina mogu ući u krvni tok i poremetiti stanice na mjestima gdje i nije došlo do infekcije. Ponašanje bakterija se danas proučava na njihovim interakcijama s primitivnim eukariotima kao što su protozoa. Dvije bakterije koje se često nalaze u bliskom kontaktu s raznim praživotinjama su *L. pneumophila* i *Salmonella enterica*.

2.1. Legionella

Legionela je gram negativna bakterija s najmanje 50 različitih vrsta. Tu spada i vrsta *L. pneumophila* (Sl. 1) koja uzrokuje poznatu legionarsku bolest. Recentna istraživanja su pokazala da je ta gram negativna bakterija sposobna zaraziti ljude jedino

ako je prvo zarazila amebu. Amebe koje se nalaze u vodama pod antropogenim utjecajem, ali i u prirodnim vodama esto sadržavaju *L. pneumophila*. Ne samo da bakteriji pružaju nutrijente, nego je isto tako i štite od raznih imbenika koji bi mogli uništiti bakterije u tim vodama, kao što je npr. kloriranje vode (Omar, Lian-Yonh, Yousef, 2000). *L. pneumophila* može se na i u široko rasprostranjenim vodenim ekosustavima, gdje se razmnožava i raste unutar eukariotskih stanica, prvenstveno amebama. Važna posljedica tog intracelularnog života u amebama je da se mogu unutar tih stanica i razmnožavati i tako rasti izvan svojih primarnih domadarskih stanica, odnosno izvan ljudskih stanica (Omar, Lian-Yonh, Yousef, 2000). Otkriveno je da su jednaki geni potrebni za zarazu amoebe i ovjeka, te se smatra da određene patogene karakteristike bakterija uspijevaju i u suživotu s amebom. To se ustanovilo nakon što se pronašlo da *L. pneumophila* koje žive unutar ameba imaju ve u virulenciju prema ljudskim stanicama, a također i ve u otpornost prema anti-bakterijskim spojevima.



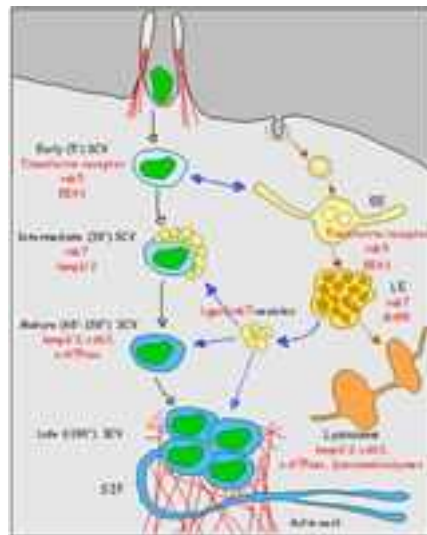
Slika 1 Izolirana *L. pneumophila*

(<http://mcb.berkeley.edu/labs/vance/research.html>)

2.2. Salmonella

Salmonella je također jedan rod gram negativnih bakterija, unutar kojeg se nalaze neke poznate vrste, koje uzrokuju bolesti kod ljudi. Među najpoznatijima je salmoneloza. Salmonele su fakultativni anaerobi koji dobivaju svoju energiju kroz oksidativne i reduktivne reakcije. Većina vrsta stvara hidrogen sulfide koje se lako može detektirati na rastu u kolonijama. Pronađeno je da vrste unutar ovoga roda, isto kao i kod roda

Legionella, znaju ulaziti u stanice praživotinja, gdje nastavljaju živjeti. Ovaj slučaj je primijenjen kod vrste *Salmonella enterica*. Primijenjeno je da ovaj bliski suživot ta dva organizma, isto kao i s legionelom, unapređuje bakterijske sposobnosti zaraze. U inak tog suživota na protozoa će dalje biti detaljnije razmotren. Salmonele koje se nalaze unutar protozoa su unutar hranidbenog mjehurića, gdje se ne razgrađuju. Dapače, nakon izlaska iz stanice još uvijek imaju onaj tanki sloj hranidbenog mjehurića oko sebe, koji bi mogao služiti kao dobra zaštita (Brandl, Benjamin, Sharon, 2005). Put prema otpornosti unutar hranidbenog mjehurića je prikazan na slici 2. Nakon što je salmonela izbačena i nalazi se unutar hranidbenog mjehurića, bolje je zaštićena je od UV zračenja i nepovoljnih temperatura nego prije ulaska u praživotinju. Istraživanja su pokazala da u prirodnoj vodi puno više jedinki salmonela preživi unutar izbačenog hranidbenog mjehurića u odnosu na „gole“ salmonele (Brandl, Benjamin, Sharon, 2005).



Slika 2 Ulazak Salmonelle u stanicu domaćina

(<http://www.landesbioscience.com/curie/chapter/792/>)

3. Protozoa

Prijevod imena znaio bi da su protozoa pra-životinje. Ipak, među njima su samo neke skupine imale zajedničkog pretka sa životinjama, dok se druge skupine nalaze daleko od životinja na filogenetskom stablu. Radi se o jednostaničnim eukariotskim organizmima. Sam činjenica da su to eukariotske stanice nam ukazuje na to da su puno veće nego bakterije, a prosječno su velike od 10 do 50 μm . Unutar protozoa postoji puno vrsta koje su patogene za ljude. Većina praživotinja su rasprostranjene na jako velikom arealu što ih čini kozmopolitskim vrstama. Iako su ljudske stanice eukariotske, postoje velike razlike u odnosu na praživotinje u posljedicama zaraze od strane bakterija. Ponekad bakterije poput *L. pneumophila* mogu ući u praživotinje, ali ih ne oštećuju, već postanu virulentne tek nakon što uđu u ljudske stanice. Tu je bitno ustanoviti kakvu korist te bakterije imaju od svojih domaćina protozoa, što im onda omogućuje da zaraze ljudske stanice. Isto tako je bitno ustanoviti kakvu ulogu imaju te praživotinje za rasprostranjenje raznovrsnih bakterija na većim arealima. Vezano uz to nastao je izraz rezervoar bakterija, jer se protozoa pokazuju kao bitan rezervoar za patogene bakterije (Michael, John, 1999). Dvije svoje praživotinje će se detaljnije spomenuti u ovom seminaru: *Acanthamoeba castellanii* i *Tetrahymena*. Te dvije svoje su nam bitne upravo radi toga što njih infektiraju već spomenute bakterije *L. pneumophila* i *S. enterica*, te se u ovome području provodi sve više istraživanja.

3.1. Acanthamoeba

U rod *Acanthamoeba* spadaju slobodno živeće amebe koje su raspršene na velikom arealu. Nalaze se u raznim vodenim ekosustavima poput slanih voda, slatkih voda, bazena, ali čak i u destiliranim i prerađenim vodama, što znači da su vrlo rezistentne na loše okolišne uvjete (Abd, 2006). Ta karakteristika im omogućuje tako široku rasprostranjenost, te su postale dobro „skladišno“ mjesto za još manje organizme poput bakterija. Jedinke roda *Acanthamoeba* imaju dvije faze životnog ciklusa, stadij

ciste i stadij trofozoita. U stadij ciste ulaze samo pod nepovoljnim uvjetima, dok se u stadiju trofozoita slobodno kreću i koriste pseudopodije, te se aktivno hrane. Ulazak hrane je omogućen pinocitozom i fagocitozom. Bakterije u stanicu ulaze pomoću fagocitoze gdje završe u hranidbenom mjehuriću unutar ove eukariotske stanice (Abd, 2006). U ovakvim hranidbenim mjehurićima inače se dešavala probava, ali radi kemijskih reakcija neke vrste bakterija uspijevaju nastaviti živjeti pod puno sigurnijim uvjetima. Bakterije naime uspijevaju spriječiti stapanje lizosoma s fagosomom. Postoji 25 vrsta roda *Acanthamoeba* koje su patogene za ljude među kojima je i *A. castellani* (Sl. 3). Vrsta ne mora biti patogena da bi djelovala kao sredstvo za prijenos bakterija na ljude.

Acanthamoeba je dobila ulogu uzorka za proučavanje interakcije eukariotskih s prokariotskim stanicama. Ova vrsta interakcije jedna je vrsta simbioze. Inače proučavanje interakcija mikro-organizama ne traje duže od tri dana, ali proučavanje interakcija *Acanthamoeba* s bakterijama može trajati nekoliko tjedana. To nam pokazuje koliko mogu biti komplicirane veze među tim vrstama. Vrlo je bitno to da su *Acanthamoeba* predatori, i aktivno uzimaju bakterije za hranu. Upravo sposobnosti kao što su stvaranje cista, predatorska uloga te suživot s raznim bakterijama, uz otpornost na životne uvjete ali i na antibiotike i sl., čine ih vrlo dobrim primjerom za proučavanje interakcija eukariota i prokariota, te mogu imati alat za kultiviranje određenih bakterija (Abd, 2006).



Slika 3. *Acanthamoeba castellani*

3.2. Tetrahymena

Drugi zanimljivi primjer mikro interakcija su slobodno živu i trepetljikaši roda *Tetrahymena* i bakterije. Vrste roda *Tetrahymena* mogu biti slobodno živu i bakteriovoru (Sl. 4), patogene ili komenzali, odnosno u životnom ciklusu mogu mijenjati na in preživljavanja. Kao i ve ina praživotinja,, vrste ovog roda isto žive u vodenim ekosustavima pa ak i u vodi u tlu. Žive na velikom arealu pod različitim uvjetima, hrane se na raznim mikro-organizmima, i lako ih je kultivirati na dostupnim medijima. Radi ovih razloga puno vrsta unutar ovoga roda postalo je još jedan dobar uzorak za proučavanje interakcija između prokariota i eukariota. Kao što je već spomenuto, *Tetrahymena* se često nalazi u simbiozi sa vrstom *S. enterica*. Nakon suživota ova dva organizma, salmonela izađe puno rezistentnija nego što je bila prije nego što je ušla u jedinku roda *Tetrahymena*. Što se točno događa nakon ulaska ove bakterije u ovakvu vrstu simbioze? Nakon što se nalazi u hranidbenom mjehuriću, salmonela ima sposobnost udruživati se s više bakterija iste vrste. Pronađeni su mjehurići s preko 50 jedinki *Salmonella*, i smatra se da one bakterije koje su okružene drugim bakterijama, imaju veću zaštitu od negativnih vanjskih uvjeta (Brandl, Benjamin, Sharon, 2005).

Pronađeno je da nisu samo više zaštićene od negativnih vanjskih uvjeta nego već i od dezinficijensa. Također se pokazalo da salmonele, unutar hranidbenih mjehurića, imaju tri puta veću šansu preživljavanja unutar slabo koncentrirane otopine kalcij hipoklorida (Brandl, Benjamin, Sharon, 2005). Kalcij hipoklorid se koristi kao dezinficijens hrane prije nego što dospije na tržište. Ovo je istraživanje prvo uspjelo pokazati da salmonele, nakon što su izašle iz jedinke roda *Tetrahymena* pokazuju veću otpornost na metode obrade hrane. Dobiveni rezultati sugeriraju da su potrebne nove metode pri obradi hrane. Daljnja istraživanja se baziraju na ispitivanjima kako genetički utječu na njihove interakcije te koliko ima sličnosti u zarazi praživotinje i čovjeka.



slika 4 *Tetrahymena* (lijevo) i bakterijski plijen (desno)

(<http://www.sciencedaily.com/releases/2007/12/071203103405.htm>)

4. Zaključak

Prema danas poznatim interakcijama između protozoa i patogenih bakterija, bakterije u praživotinjama nalaze nove „rezervoare“ koji ih ujedno i ojačavaju. Prema nekim teorijama patogene bakterije su našle novi put ka općem i to kroz razne vrste protozoa. *L. pneumophila*, kao primjer uzet u ovom radu, iz interakcije s praživotinjama profitira boljom mogućnošću rasprostranjenja i boljom sposobnošću u patogenosti. Jedan uzrok ove simbioze vjerojatno je općeg. U modernom vremenu, mikro-svijet je bombardiran raznim antibioticima i kemikalijama s ljudske strane, što mora primorati mikroorganizme na nove načine preživljavanja. Drugim riječima, možemo reći i da ljudi ubrzavaju postizanje takvih novih sposobnosti kod patogenih bakterija.

Istraživanja genetske kontrole interakcije rodova *Salmonella* i *Tetrahymena* mogla bi omogućiti kontrolu slijeda njihovih koraka patogenih bakterija. Na patogene bakterije bi se moglo indirektno utjecati preko protozoa.

5. Literatura

-Omar, S. H., Lian-Yonh, G., Yousef, A. K., (2000): From protozoa to mammalian cells; a new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens: Environmental microbiology 2(3), 251 - 265

- Michael, R. W. B., John, B. (1999): Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms: Trends in Microbiology Vol. 7, str. 46 - 50

-Brandl, T. M., Benjamin, M. R., Sharon, G. B., (2005): Protozoa the inside story: Applied and environmental biology, Agricultural research str. 4 - 5

- Abd, H. (2006): Interaction between waterborne pathogenic bacteria and Acanthamoeba castellanii: From the Division of Clinical Bacteriology

-<http://www.textbookofbacteriology.net/pathogenesis.html>

-http://en.wikipedia.org/wiki/Legionella_pneumophila

-http://www.tntech.edu/wrc/pdfs/TchReport07_08/IntracnslmnlEntrica.pdf

-<http://en.wikipedia.org/wiki/Salmonella>

-<http://en.wikipedia.org/wiki/Protozoa>

-<http://en.wikipedia.org/wiki/Tetrahymena>

<http://www.zoology.ubc.ca/courses/bio332/Labs/CiliateProject/tetrahymena/TETRAweb.htm>

-<http://www.landesbioscience.com/curie/chapter/792/>

-<http://mcb.berkeley.edu/labs/vance/research.html>

-<http://www.sciencedaily.com/releases/2007/12/071203103405.htm>

6. Sažetak

Sve su nam više poznate interakcije između patogenih bakterija i protozoa. Neke bakterije postaju patogene tek nakon života unutar praživotinje. Protozoa je skupina unutar koje su neke vrste vrlo dobro prilagođene na razne uvjete na Zemlji. Pronađeno je da neke bakterije iskorištavaju tu rasprostranjenost protozoa u svoju korist i tako si šire areal. Tako se razvijaju složene patogene sposobnosti kako bi mogle zaraziti kompleksnije organizme.

U ovome se radu koriste *L. pneumophila* i *S. enterica* kao uzorci patogenih bakterija, koje ulaze u simbiozu s protozoa (*Acanthamoeba castellanii* i rod *Tetrahymena*). Ove interakcije su značajne za razvoj i preživljavanje tih bakterija. Nama su takva istraživanja bitna da bi mogli predvidjeti, a i potencijalno kontrolirati slijedeće korake patogenih bakterija.

7. Summary

Interactions between pathogenic bacteria and protozoa are becoming thoroughly understood. There are bacteria which become pathogenic only after they interact with a protozoa. Protozoa are microorganisms that are very well adapted to the various conditions on Earth today. It has been proven that a variety of bacteria are using these adaptations for their own advantages. These advantages are a wider living area under a big variety of environmental conditions and a more complex system of infection that allows them to infect more complex organisms.

In this essay *L. pneumophila* and *S. enterica* are the two bacteria used as role models for prokaryotic and eukaryotic interactions, while in the same time *Acanthamoeba castellanii* and the genus *Tetrahymena* are used as role models for these interactions as protozoans. Interactions between protozoa and bacteria have been well known of but it is only today that we are realizing their significance in bacteria development and survival. Research in this field may be vital for holding a dominant role against disease caused by pathogenic bacteria.